

**Patent number:** JP63196297

**Publication date:** 1988-08-15

**Inventor:** USUI YASUICHI; others: 02

**Applicant:** YAIZU SUISAN KAGAKU KOGYO KK; others: 01

**Classification:**

- international: C12P19/00; C12P19/14; C12P19/22

- european:

Application number: JP19870027471 19870209

Priority number(s):

Abstract of JP63196297

**PURPOSE:** To produce a maltooligosaccharide derivative in high yield and purity, by treating a mixture of O-glucosyl derivative such as maltooligosaccharide with an amylase in a solvent.

**CONSTITUTION:** A mixture of an O-glucosyl derivative and maltooligosaccharide or a substance giving maltooligosaccharide by the action of an amylase is treated with an amylase in a mixture of water and a hydrophilic organic solvent such as methanol, ethanol, acetone, etc. The maltooligosaccharide used in the above process is those having a glucose polymerization degree of 2-7 and the substance forming a maltooligosaccharide by the action of amylase is a decomposed starch which forms a maltooligosaccharide having a polymerization degree of 2-7 as a main component by the action of amylase. A maltooligosaccharide derivative having high purity can be produced by this process in high yield. The produced derivative can be used as a substrate for determination of alpha-amylase activity and as various physiologically active substances.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

## ⑫ 公開特許公報 (A)

昭63-196297

⑬ Int. Cl. 1

C 12 P 19/00  
19/14  
19/22

識別記号

厅内整理番号

⑭ 公開 昭和63年(1988)8月15日

7236-4B  
7236-4B  
7236-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全6頁)

⑮ 発明の名称 マルトオリゴ糖誘導体の製造方法

⑯ 特願 昭62-27471

⑰ 出願 昭62(1987)2月9日

⑮ 発明者 碓水泰市 静岡県静岡市大谷836番地  
 ⑮ 発明者 中久喜輝夫 静岡県三島市加茂57 加茂グリーンヒル7号  
 ⑮ 発明者 坂井和男 静岡県焼津市小川新町5-8-13  
 ⑯ 出願人 焼津水産化学工業株式会社 静岡県焼津市小川新町5丁目8番13号  
 ⑯ 出願人 日本食品化工株式会社 東京都千代田区丸の内3丁目4番1号  
 ⑯ 代理人 弁理士 中村 稔 外4名

## 明細書

1. 発明の名称 マルトオリゴ糖誘導体の製造方法

## 2. 特許請求の範囲

- (1) 親水性有機溶媒と水との混合溶媒中で、マルトオリゴ糖、又はアミラーゼの作用によってマルトオリゴ糖に変換される物質とローグルコシル誘導体との混合物に、アミラーゼを作用させることを特徴とするマルトオリゴ糖誘導体の製造方法。
- (2) 親水性有機溶媒がメタノール、エタノール、n-ブロパノール、イソブロパノール、アセトン、ジオキサン、ホルムアミド、ジメチルスルホキサイド、エチレングリコール、プロピレングリコール又はこれらの混合物である特許請求の範囲第(1)項記載の製造方法。
- (3) マルトオリゴ糖が、グルコースの重合度2~7のマルトオリゴ糖である特許請求の範囲第(1)項記載の製造方法。
- (4) アミラーゼの作用によってマルトオリゴ糖に

変換される物質が、アミラーゼによって重合度2~7のマルトオリゴ糖を主成分として生成し得る澱粉分解物である、特許請求の範囲第(1)項記載の製造方法。

- (5) アミラーゼがマルトオリゴ糖生成アミラーゼ又はグルコアミラーゼである特許請求の範囲第(1)項記載の製造方法。

## 3. 発明の詳細な説明

## 〔産業上の利用分野〕

本発明は、マルトオリゴ糖誘導体の新規な製造方法に関する。更に詳しくは、高収率で高純度のマルトオリゴ糖誘導体の製造方法に関する。

## 〔従来の技術〕

従来、 $\alpha$ 、 $\beta$ -核置換フェニルマルトオリゴ糖等のマルトオリゴ糖誘導体の製造方法としては、化学的合成法及び酵素法が知られている。

化学的合成法は、以下のようにして行われる〔特開昭54-25893号〕。マルトペンタオース、マルトヘキサオース等のマルトオリゴ糖を、アセチル化して水酸基を保護した後、アセチル化マルトオリゴ糖の末端をハロゲン化する。次いで得られたハロゲン化アセチルマルトオリゴ糖に $\alpha$ 、 $\beta$ -核置換フェノールをピリジン等の溶媒の存在下に作用させると $\alpha$ 、 $\beta$ -核置換フェニルマルトオリゴシドのアセチル化物が得られる。得られたアセチル化物を脱アセチル化して目的とする $\alpha$ 、 $\beta$ -核置換フェニルマルトオリゴシドを得る。

体液中の $\alpha$ -アミラーゼ活性測定用基質、各種生理活性物質、天然低カロリー甘味料、色素等として利用されている。例えば、ヒト体液中の $\alpha$ -アミラーゼ活性測定用基質としてマルトオリゴ糖誘導体を用いると、測定が簡便で、かつ自動分析計による分析に対する適応性が良いという利点を有している。ところが、該測定用基質としては、高純度のマルトオリゴ糖誘導体が必要とされる。しかるに前記従来法では、高純度のマルトオリゴ糖誘導体の調製は容易ではなかった。

## 〔発明が解決しようとする問題点〕

そこで本発明は、高純度のマルトオリゴ糖誘導体を高収率で製造できるマルトオリゴ糖誘導体の製造方法を提供することを目的とする。

## 〔問題点を解決するための手段〕

本発明は、親水性有機溶媒と水との混合溶媒中で、マルトオリゴ糖、又はアミラーゼの作用によってマルトオリゴ糖に変換される物質と $\alpha$ -グルコシル誘導体との混合物に、アミラーゼを作用させることを特徴とするマルトオリゴ糖誘導体の製

酵素法は、以下のように行われる〔Carbohydrate Research 61 (1978), 359~368〕。 $\alpha$ -シクロキストリンと $\alpha$ 、 $\beta$ -核置換フェニルグルコキシドにサイクロデキストリングリコシルトランスフェラーゼ等の転移酵素を作用させると、 $\alpha$ 、 $\beta$ -核置換フェニルマルトオリゴシドの混合物が生成する。次いで得られた混合物をカラムクロマトグラフィーにより分画して、目的とする $\alpha$ 、 $\beta$ -核置換フェニルマルトオリゴシド、例えば $\alpha$ -ニトロフェニル- $\alpha$ -D-マルトヘプタオシドを得る。

しかるにこれらの方法のうち化学的合成法は、工程が多く煩雑で、収率も低く又 $\alpha$ 、 $\beta$ 体を自由に調製し得ないという欠点がある。

又、酵素法は、反応工程は簡便であるが、重合度の接近する同族体を多く生成する。そのため、グルコースの重合度の異なったものの混合物となり、高純度品を得るためににはクロマトグラフィーによる分画が必要であった。また収率も低いという欠点もあった。

ところでマルトオリゴ糖誘導体は、従来、ヒト

造方法に関する。

以下本発明について説明する。

本発明において用いられる「マルトオリゴ糖」とは、グルコースの重合度2~7のマルトオリゴ糖である。マルトオリゴ糖の例として、マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオース等を挙げることができる。これらのマルトオリゴ糖は単独又は混合物であってもよく、マルトオリゴ糖源としてマルトオリゴ糖を主成分とする澱粉分解物を用いることもできる。又、本発明においては、マルトオリゴ糖の他にアミラーゼの作用によってマルトオリゴ糖に変換される物質を用いることができる。アミラーゼの作用によってマルトオリゴ糖に変換される物質としては、例えばアミラーゼによって重合度2~7のマルトオリゴ糖を主成分として生成し得る澱粉分解物を挙げることができる。

一方、本発明において用いる $\alpha$ -グルコシル誘導体とは、糖部非還元末端がグルコースである。

-グルコシル化合物をいう。

例えば、 $\alpha$ -アミラーゼ活性測定用基質として有用な $\alpha$ 、 $\beta$ -核置換フェニルマルトオリゴシドを調製する際に用いる $\alpha$ -グルコシル誘導体としては、4-ニトロフェニル $\alpha$ -D-グルコシド、4-ニトロフェニル $\beta$ -D-グルコシド、2-クロロ-4-ニトロフェニル $\alpha$ -D-グルコシド、2-クロロ-4-ニトロフェニル- $\beta$ -D-グルコシド、2,4-ジクロロフェニル- $\beta$ -D-グルコシド、2,6-ジクロロ4-ニトロフェニル $\beta$ -D-グルコシド等を挙げることができる。

更に、生理活性を有する $\alpha$ -グルコシル誘導体の例としては、アルブチン、コニフェリン、サリシン等のフェノール配糖体、センノシドA、B等のアントラセン配糖体、ステビオシド、ペルベナリン等のテルペン配糖体、ゲンチオビクリン等の苦味配糖体、ジギトニン等のステロイド配糖体、シラレンA、ラナタグリコシドA等の強心配糖体、各種ジベレリングルコシド、ビレノシノールグルコシド等のリグナン配糖体等が挙げられる。但し、

本発明で用いられる $\alpha$ -グルコシル誘導体は上記化合物に限定されるものではなく、糖部の非還元末端がグルコースである化合物であればよい。尚、本発明では、 $\alpha$ -グルコシル誘導体は、 $\alpha$ 体、 $\beta$ 体のいずれを用いてもよく、 $\alpha$ 体を用いれば $\alpha$ -マルトオリゴシドが得られ、 $\beta$ 体を用いれば $\beta$ -マルトオリゴシドが得られる。

本発明で用いるアミラーゼとしては澱粉を加水分解する酵素であれば何れを用いてもよい。但し、効率よく目的とするマルトオリゴ糖誘導体を生成させるためにはグルコアミラーゼまたはマルトオリゴ糖生成アミラーゼが好ましい。例えばグルコアミラーゼ、マルトトリオース生成アミラーゼ、マルトペンタオース生成アミラーゼ、マルトヘキサオース生成アミラーゼ等が特に好ましい。マルトース生成アミラーゼとしては、大豆、麥芽等の植物起源の $\beta$ -アミラーゼ以外に、バチルス・ボリミキサ (Bacillus polymyxa, J. Robyt and D. French, Arch. Biochem Biophys 104, 338 (1964)]、バチルス・セレウス (Bacillus cereus,

Y. Takasaki, Agric. Biol. Chem., 40, 1515-1523 (1976) ], シュードモナス属菌 [Pseudomonas sp: S. Shinke et al., J. Ferment. Technol. 53, 693-698 (1975) ]、ストレプトミセス・ヒグロスコピカス [Streptomyces higroskopicus, Y. Hidaka et al., Starke, 26, 413 (1974) ]、ストレプトミセス・プレコックス [Streptomyces praecox, 若生勝男ら, 澱粉化学, 25, 155 (1978) ]等の微生物起源のマルトース生成アミラーゼがある。

また、マルトトリオース以上のグルコース重合度を有するオリゴ糖を生成するアミラーゼとしては次のものが知られている。

マルトトリオース生成アミラーゼ [若生勝男ら: 澱粉化学, 26, 175 (1979)、ストレプトミセス・グリセウス (Streptomyces griseus) 起源のもの; 高峰義幸: 昭和58年度日本農芸化学大会要旨集, P169 (1983)、バチルス (Bacillus) 属起源のもの] マルトテトラオース生成アミラーゼ [J. P.

Robyt and R. J. Ackerman : Arch. Biochem. Biophys., 145, 105 (1971)、シュードモナス・ストッツェリ (Pseudomonas stutzeri) 起源のもの]

マルトペンタオース生成アミラーゼ [N. Saito: Arch. Biochem. Biophys., 155, 290 (1973)、バチルス・リケニホルミス (Bacillus licheniformis) 起源のもの; 小林ら: 昭和58年度日本澱粉学会大会要旨集, P301 (1983) ; 吉儀ら: 昭和59年度日本農芸化学大会要旨集, P584 (1984) ]

マルトヘキサオース生成アミラーゼ [K. Kainumaら: FEBS Lett., 26, 281 (1972)、エアロバクター・エアロゲネス (Aerobacter aerogenes) 起源のもの; J. P. Kennedy and C. A. White: Starke, 31, 93 (1979) ; 谷口ら: 澱粉化学, 29, 107 (1982); Y. Takasaki : Agric. Biol. Chem., 47, 2193 (1983) ]

本発明は、前記マルトオリゴ糖等及び $\alpha$ -グルコシル誘導体に、親水性有機溶媒と水との混合溶媒中でアミラーゼを作用させる。

本発明において、親水性有機溶媒としては特に限定ではなく、水混和性の有機溶媒であることが特に好ましい。親水性有機溶媒の例としては、メタノール、エタノール、カーボロバノール、イソブロバノール、アセトン、ジオキサン、ホルムアミド、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキサイド、エチレングリコール、プロピレングリコール、等が挙げられる。特にアルコール系の溶媒が好ましい。

これらの親水性有機溶媒は単独で使用してもよく、また2種以上を混合して使用してもよい。

水との混合溶媒における親水性有機溶媒の含有率は、溶媒の種類、基質の種類等によっても変わらるが、約20～80%、好ましくは約30～70%が適当である。

以下に本発明の反応条件について説明する。

マルトオリゴ糖等とオーグルコシル誘導体の反応時のモル比は特に限定されることはなく、反応溶媒に対する溶解度、反応速度、収率、経済性等を考慮して適宜決定すればよい。マルトオリゴ糖、

又はアミラーゼの作用によってマルトオリゴ糖に変換される物質とオーグルコシル誘導体のモル比は通常約1:1から約1:5の範囲が好ましい。

又、マルトオリゴ糖、又はアミラーゼの作用によってマルトオリゴ糖に変換される物質とオーグルコシル誘導体の混合溶媒中における合計濃度は、モル比と同様溶媒に対する溶解度、反応速度、収率等を考慮して決定すればよいが、通常10～60%、好ましくは20～50%が適当である。

反応温度は、約20～60℃の範囲の通常アミラーゼの至適温度附近で行えばよい。使用する酵素の種類、反応の速度、収率等を考慮して選定することができる。反応pHは、使用する酵素の至適pH附近、通常約4～8の範囲が適当である。

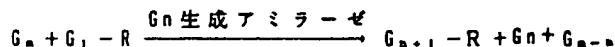
反応時間は、反応温度、酵素の使用量によって異なるが、通常約2時間～120時間、好ましくは約12時間～48時間の範囲が適当である。

反応は、可溶性酵素を用いるバッチ式、あるいは固定化酵素を用いる連続式の何れの反応形式を用いても行うことができる。反応終了後pHを酸

性又はアルカリ性にするか、加熱して酵素反応を停止した後、カラムクロマトグラフィー、溶媒抽出等によって分画を行い、目的とするマルトオリゴ糖誘導体を得ることができる。

また分画の際に未反応のオーグルコシル誘導体画分を回収し、繰り返し再使用することも出来、これによりオーグルコシル誘導体よりのマルトオリゴ糖誘導体の収率を高めることが出来る。

本発明の主反応は次式の如く表すことができる。



ここにおいて  $G_n$ 、 $G_1$  はそれぞれグルコースの重合度が  $n$ 、1 であるマルトオリゴ糖を表し、 $G_1 - R$  はオーグルコシル誘導体で  $R$  はアグリコン部を表す。オーグルコシル誘導体の糖部の糖の重合度は1以上でもよいが、ここでは非還元末端のグルコースのみを  $G_1$  で表すものとする。 $n$  はそれぞれ整数で  $n < m \leq 2n$ 、 $n = 1 \sim 6$  の関係を有する。

上記反応を水浴液中で行うと加水分解反応が速

やかに進行して  $G_n$  及び  $G_{n-1}$  が主生成物となり、転移反応によるマルトオリゴシド誘導体 ( $G_{n+1} - R$ ) の生成は少なくマルトオリゴ糖誘導体を上記の反応により生成させ採取することは極めて困難である。

しかるに本発明のように親水性有機溶媒と水との混合溶媒中で反応を行うと、加水分解反応が抑制され、オーグルコシル誘導体をアクセプターとし、マルトオリゴ糖等をドナーとする転移反応が著しく促進される。

即ち、本発明によれば親水性有機溶媒と水との混合溶媒中でマルトオリゴ糖とオーグルコシル誘導体にアミラーゼを作用させるという極めて簡便な方法で効率よくマルトオリゴ糖誘導体を製造することができる。

本発明の製造方法によって、例えばヒト体液中の  $\alpha$ -アミラーゼ活性測定用基質として有用なマルトオリゴ糖にアグリコンとして発色団が結合したマルトオリゴ糖誘導体を調製することができる。

このようなマルトオリゴ糖誘導体は、オーグル

コシダーゼおよび/または $\beta$ -グルコシダーゼの存在下に $\alpha$ -アミラーゼを作用させると発色団を遊離するため、ヒト体液、例えば血清、尿等に含まれる $\alpha$ -アミラーゼ活性の測定用基質として有用である。

又、本発明の製造方法によって、例えば生理活性を有する $\alpha$ -グルコシル配糖体のグルコース残基にマルトオリゴ糖が結合したマルトオリゴ糖配糖体を得ることができる。これらの配糖体の糖部にマルトオリゴ糖が結合したものは、溶解度、呈味、生理活性、安定性等の物性の改善が期待される。

生理活性を有する $\alpha$ -グルコシル配糖体としては、例えば、利尿剤として有用なアルブチン、咳薬として有用なコニフェリン、鎮痛剤として有用なサリシン等のフェノール配糖体、皮膚薬、眼疾薬として有用なエスクリン等のクマリン配糖体、下剤として有用なセンノシドA、B等のアントラセン配糖体、健胃、強壮剤、甘味料として有用なステヒオシド、凝血剤、子宮収縮剤として有用なベル

ペナリン等のテルベン配糖体、抗マラリヤ剤として有用なゲンチオビクリン等の苦味配糖体、コレステロール沈殿剤として有用なジギトニン等のステロイド配糖体、強心作用を有するシラレンA、ラナタグリコシドC等の強心配糖体、植物伸長作用を有する各種シベレリングルコシドであるジベレリン配糖体、血圧降下作用、強壮作用を有するビノレシノールジグルコシド等のリグナン配糖体を挙げることができる。

以下に実施例を挙げて更に具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

#### 実施例1

##### 4-ニトロフェニル- $\beta$ -D-マルトペンタオシドの調製

マルトペンタオース 240 mg (0.29 mM) と 4-ニトロフェニル- $\beta$ -D-グルコシド 260 mg (0.86 mM) (モル比 1 : 3) とを、1.5 mM 酢酸バッファー (pH 6.0) + メタノール (1 : 1) 溶液に加え全量 1 mL とした。

これに酵素としてシュードモナス スッウェリ

(*Pseudomonas stutzeri*) 由来のマルトテトラオース生成アミラーゼ 0.2 単位 (1% 可溶性澱粉を基質として 1 分間に 1  $\mu$ M のグルコシド結合を分解する酵素量を 1 単位とする) を加え、30℃で 48 時間反応を行った。

反応終了後 0.2 M ホウ酸バッファー (pH 9.8) を加えて反応を停止し、濃縮した。Bio-Gel-p2 を用いてゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより反応生成物を分画して、4-ニトロフェニル- $\beta$ -D-マルトペンタオシド (純度 99.2%) 90 mg を得た (収率 32.7%)。分画して得られた生成物が 4-ニトロフェニル- $\beta$ -D-マルトペンタオシドであることは、核磁気共鳴スペクトルにより確認した。

#### 実施例2

##### 4-ニトロフェニル- $\alpha$ -D-マルトペンタオシドの調製

マルトペンタオース 120 mg (0.14 mM) と 4-ニトロフェニル- $\alpha$ -D-グルコシド 84 mg (0.28 mM) (モル比 1 : 2) とをメタノール-

酢酸バッファー (pH 6.0) (メタノール 50%) に溶解し、全量 1 mL とした。これにマルトテトラオース生成アミラーゼ 0.2 単位を加え 30℃で 20 時間反応を行った。

反応終了後実施例1と同様に処理し、1.8 mg の 4-ニトロフェニル- $\alpha$ -D-マルトペンタオシド (純度 99.5%) を得た (収率 13.1%)。

分画して得られた生成物が 4-ニトロフェニル- $\alpha$ -D-マルトペンタオシドであることは核磁気共鳴スペクトルにより確認した。

#### 実施例3

##### 4-ニトロ-2-クロロ- $\beta$ -D-マルトヘプタオシドの調製

マルトヘプタオース 600 mg (0.52 mM) と 4-ニトロ-2-クロロフェニル- $\beta$ -D-グルコシド 700 mg (2.08 mM) (モル比 1 : 4) とをメタノール-酢酸バッファー (1.5 mM pH 6.0) 溶液 (メタノール 40%) に加え全量を 5 mL とした。

これにアエロバクター アエロゲネス

(*Aerobacter aerogenes*) 由来のマルトヘプタオース生成アミラーゼ 0.4 単位 (1 % 可溶性澱粉を基質として 40 ℃において 1 分間に 1  $\mu$ ll のグルコシド結合を切断する酸素量を 1 単位とする) を加え、30 ℃で 18 時間反応を行った。

反応終了後実施例 1 と同様に処理し、120 mg の 4-ニトロ、2-クロロフェニル- $\beta$ -D-マルトヘプタオシド (純度 98.9 %) を得た (収率 15.2 %)。

分画して得られた生成物が、4-ニトロ、2-クロロフェニル- $\beta$ -D-マルトヘプタオシドであることは、核磁気共鳴スペクトルにより確認した。